

08.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 2 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 6 1 1 8 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 6 1 1 8 3]

出 願 人 富士写真フイルム株式会社
Applicant(s):

REC'D 02 DEC 2004

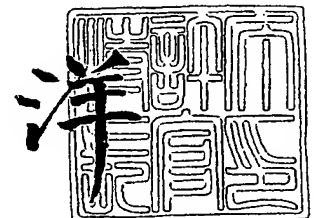
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 0310040
【提出日】 平成15年10月21日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61M 1/34
C12N 15/10
B01D 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市扇町2丁目12番1号
富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 繁定 啓司

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県小田原市扇町2丁目12番1号
富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 藤原 盛男

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号
富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 森 寿弘

【特許出願人】
【識別番号】 000005201
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】
【識別番号】 100064414
【弁理士】
【氏名又は名称】 磯野 道造
【電話番号】 03-5211-2488

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015392
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0016369

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

第 1 開口と第 2 開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第 1 開口側から前記第 2 開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、

前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第 2 開口とを連通する排出部とを有し、

前記排出部の前記第 2 開口を形成する部分の肉厚は、0.2 mm 以上であることを特徴とする核酸分離精製カートリッジ。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸分離精製カートリッジ

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸を分離するための核酸分離精製カートリッジに関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、遺伝子組換えの分野において、核酸はプローブ、ゲノム、あるいはプラスミドなどの形態で広く用いられている。

【0003】

また、核酸は医療の分野においても、種々の形態で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出や診断に日常的に用いられているほか、遺伝子の欠損等により起因する疾患の検出にも用いられている。さらに、核酸は細菌に起因する食品汚染の検出にも用いられている。また、核酸は遺伝子地図の作製からクローニングや遺伝子組換えによる発現において、興味ある遺伝子の位置確認、同定および単離に日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量しか入手できず、単離および精製操作が煩雑で時間を要する。また、このような煩雑な操作を行うことは核酸の損失に結びつき易い。さらに、血清、尿あるいはバクテリアの培養液から得られた試料の核酸の精製においては、精製過程における核酸のコンタミネーションや疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた分離精製方法の一つとして、例えば、特許文献1には、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、引き続き行われる洗浄、脱離等の操作によって分離精製する方法が開示されている。

【0006】

この方法は分離性能としては優れたものであったが、簡便性、迅速性、自動化および小型化適性においては十分でなく、同一性能の吸着媒体の工業的大量生産が困難であり、かつ、取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題があった。

【0007】

これらの問題は後に、特許文献2に記載されている発明、すなわち、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱離させる工程を含む核酸の分離精製方法、及び少なくとも2つの開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いることにより解決されている。

【0008】

特許文献2に記載されている核酸分離精製ユニットについてもう少し詳しく説明すると、当該ユニットは、加圧-減圧を操作する圧力差発生装置によって、当該ユニットの内部を減圧状態にして試料溶液を当該ユニット内に吸入する。そして、この試料溶液中の核酸を当該ユニット内の固相（膜）に吸着させ、再び圧力差発生装置を操作することによりユニット内を加圧状態にして余分な試料溶液を排出している（図6参照）。

【0009】

このようにして固相に吸着された核酸を、核酸以外の不純物を洗浄液で洗い流す洗浄工程、回収液で膜に吸着されている核酸を固相から回収するための回収工程を行うことにより核酸を分離精製している。

【0010】

しかし、この核酸分離精製ユニットでは、2つの開口のうち一の開口Xは、常に圧力差発生装置に接続しておく必要があり、他の開口Yのみを試料溶液、洗浄液あるいは回収液の吸入・排出に使用するものであるため、作業効率が良くないという問題点があった（図6参照）。

【特許文献1】 特公平7-51065号公報（段落0018）

【特許文献2】特開2003-128691号公報（段落0011～段落0019、段落0032～段落0054、図1及び図2）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、煩雑な操作を省き、かつ、作業効率を向上させるために、一方の開口から試料溶液、洗浄液あるいは回収液（以下、溶液等という。）を順次供給すると共に、この一方の開口には加圧装置を接続して空気を圧送することにより、これら溶液等を加圧し、他方の開口を溶液等の排出専用とすることにより、飛躍的に作業効率を向上させたシステムを開発中である。

そして、本発明者らは、かかるシステムにおいて核酸を効率良く分離精製するために、核酸を着脱することのできる多孔性の膜を有する核酸分離精製カートリッジを採用することを考えている（図7参照）。

【0012】

しかし、核酸分離精製カートリッジ内の溶液等を排出し終わった後も加圧装置により継続して空気を圧送すると、膜が多孔性であるが故に、この溶液等が膜を通過した際に細かい泡を生じることがある。かかる現象は粘性の高い試料溶液において特に生じ易い。

【0013】

そして、このようにして生じた細かい泡は加圧された空気によって、溶液等を排出するための他の開口まで運ばれ、排出部102の開口近傍に溜まる。さらに、この開口から吹き出したエアは、当該カートリッジの下部に配置されている廃液容器100の内部で巻き上がり、巻き上がったエアによってこの泡が排出部の外壁面にまで回り込んで、そこに付着する。

【0014】

その後、洗浄工程における洗浄液（水溶性有機溶媒）や、回収工程において精製された核酸を回収するための回収液（TEバッファ）をそれぞれ通流・排出させるが、洗浄液は核酸分離精製カートリッジに対する濡れ性が低いので、排出部の外壁面に付着した泡を取り込むことができない。一方、回収液は核酸分離精製カートリッジに対する濡れ性が高いので、排出部の外壁面に回りこんだ泡を引き戻して回収液に取り込み、精製された核酸と共に回収してしまう。

【0015】

回収液によって取り込まれた泡（試料溶液）は、いわば洗浄前の状態の溶液であるので、回収液によって回収された核酸に対しては不純物となる。すなわち、核酸の精製率を悪化させるという問題や、後工程において回収された核酸を使用して実験・研究する際に、酵素反応を阻害する虞がある。

【0016】

本発明は、前記課題に鑑みて創案されたものであり、その目的は、排出部の外壁面に溶液等が付着しない構成とした核酸分離精製カートリッジを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者らは、鋭意研究した結果、核酸分離精製カートリッジを以下のように構成することで前記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の核酸分離精製カートリッジは、第1開口と第2開口を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔性膜を備え、前記第1開口側から前記第2開口側へ向けて核酸を含む試料溶液を加圧ガスにより通流させることで、前記核酸吸着性多孔性膜に核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジであって、前記筒状体は、前記核酸吸着性多孔性膜を支持する底部を有する筒状本体と、前記底部に形成された底部開口と前記第2開口とを連通する排出部とを有し、前記排出部の前記第2開口を形成する部分の肉厚は、0.2mm以上であることを特徴とする。

なお、前記第2開口を形成する部分の肉厚は、0.5mm以上であることがさらに好ま

しい。

【0018】

排出部の第2開口における肉厚がこのような厚みを有することにより、泡がエアで巻き上げられた場合であっても、排出部の外壁面まで泡が回り込むことがなく、外壁面への泡の付着を防止することができる核酸分離精製カートリッジを具現することができる。特に、排出部が筒状に形成されている場合に、この排出部の外壁面に泡が回り込むことを防止することができる。

【0019】

前記した核酸分離精製カートリッジにおいては、前記第2開口の開口径が1.0mm以上であり、かつ、前記第2開口を形成する部分の肉厚が0.2mm以上であり、さらに、前記第2開口を形成する部分の外径が1.4mm以上であることが好ましい。

なお、前記第2開口を形成する部分の外径は、2.0mm以上であることがより好ましい。

【0020】

このように第2開口の開口径と、第2開口を形成する部分の肉厚と、第2開口を形成する部分の外径とを規定したことにより、良好な排出性、排出部の外壁面への泡の付着防止性を具備した核酸分離精製カートリッジを具現することができる。

【0021】

また、前記した核酸分離精製カートリッジにおいては、前記排出部の端面と、前記排出部の外壁面とのなす角度を、 105° 以下とするのが好ましい。なお、排出部の端面と外壁面とのなす角度を 100° 以下とするのがより好ましく、 95° 以下とするのがさらに好ましい。

また、排出部の端面の形状を第2開口へ近づくにつれ開口径が広がる漏斗形状としてもよい。この場合、前記排出部の端面と外壁面のなす角度を、 30° 以上とするのがよい。

【0022】

排出部の端面と、排出部の外壁面とのなす角度をこのように形成したので、排出部の外壁面に試料溶液の泡が回り込み難い核酸分離精製カートリッジを具現することができる。また、外壁面に泡が付着した場合であっても、その泡は排出部の第2開口近傍に戻り易く、洗浄液によってこれを取り除くことが容易な核酸分離精製カートリッジを具現することができる。結果、回収液に未処理の試料溶液の混入を防止することができる核酸分離精製カートリッジを具現することができる。また、排出部の端面の形状を第2開口へ近づくにつれ開口径が広がる漏斗形状とすると、発生した泡が当該外壁面にまで回り込み難くなる。さらに、排出部の端面と外壁面とのなす角度を、 30° 以上に形成してもよい、このようにすると泡の回り込みを防止することができる。

【0023】

さらに、前記した核酸分離精製カートリッジにおいては端面および外壁面の樹脂親水性を高めるのが好ましい。すなわち、核酸分離精製カートリッジを構成する材質を濡れ易いものとするのが好ましい。

【0024】

ここで、排出部の端面のみを考えた場合、撥水性を高めると溶液と端面との濡れ性が悪くなって溶液や泡をはじき易くなるので端面への泡の付着を防ぐことができ、また、端面から外壁面へ泡を持ち上げる表面エネルギーも大きくなる結果、泡は外壁面に付着し難くなる。しかし、前記寸法以下でテストした際に、外壁面へ回りこんだ泡は、外壁面の撥水性により表面エネルギーが強く、重力で落下しなかった。また、洗浄液も撥水してしまい、泡を引き込むことができなかった。従って、核酸分離精製カートリッジの端面および外壁面の樹脂親水性を高めることが好ましい。

なお、本発明において「濡れ性」とは溶液と対象物（端面や外壁面）とのなじみ易さであり、溶液と対象物との接触角で規定される。実験から前記した寸法・形状において端面に泡を保持することができ、かつ、洗浄工程で不純物を洗い落とすための溶液（洗浄液）と対象物との接触角としては、 100° 以下がよく、好ましくは 95° 以下、より好まし

くは90°以下である。

【0025】

また、前記した核酸分離精製カートリッジにおいては、前記排出部の端面に、泡を誘導するための爪部材を設けるのがよい。この爪部材を1本から複数本設けるのが望ましい。また、この爪部材の内側の位置を排出部の内壁面と一致するように設けるのが特に望ましい。なお、この爪部材は棒状に形成するのがさらに好ましい。

【0026】

このように構成することで、第2開口に到達した泡は、内壁面に延設された爪部材を伝ってその先端部分、すなわち、第2開口より下の位置で凝集する。その結果、凝集した泡は廃液容器に落ち易くなるので、泡が外壁面に付着し難くなる。また、エアによって泡が吹き上げられた場合であっても、これが外壁面まで到達することはない。

【発明の効果】

【0027】

本発明によれば、試料溶液の泡が、核酸分離精製カートリッジの排出部の外壁面に付着することを防止することができる。

【0028】

さらに、未処理の試料溶液の泡の混入防止を図ることができるので、核酸の精製率を向上することが可能であり、また、回収した核酸を使用した実験や研究において、酵素による反応が阻害されるなどの問題の発生を未然に防ぐことが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

次に、本発明の核酸分離精製カートリッジの実施形態について適宜図面を参照しつつ説明する。参照する図面において、図1は、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図であり、図2は、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。また、図3は、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの排出部を拡大した断面図である。図4は、本発明の他の実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの排出部を拡大した断面図である。なお、以下の説明において、「上」、「下」の表現は、核酸分離精製カートリッジの使用状態、具体的には図2に示すような状態を基準とする。

【0030】

【核酸分離精製カートリッジの構成】

まず、図1および図2を参照して、核酸分離精製カートリッジの全体的な構成について説明する。

発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジNCは、核酸吸着性多孔性膜Fと、核酸吸着性多孔性膜Fを保持するとともに、溶液が通流する通路を形成するバレル10およびキャップ20とから構成されている。

【0031】

次に、図1の分解斜視図を参照して各構成部品について、より詳細に説明する。

バレル10は、円筒状のバレル本体部12と、バレル本体部12に連なる円筒状のバレル側嵌合部13とからなり、バレル本体部12の上部には第1開口11、バレル側嵌合部13の下部には開口14が形成されている。そのため、バレル10の上方から下方に向けて、溶液等Sが通流可能である。また、バレル側嵌合部13の外径は、バレル本体部12の外径より一回り小さくなっている。

【0032】

キャップ20は、円筒状のキャップ側嵌合部25と、キャップ側嵌合部25の底部22に設けられた底部開口23に連なる排出部2とからなる。底部22に設けられた底部開口23は、前記したバレル本体部12の上部に設けられた第1開口11より小さい径を有している。また、キャップ側嵌合部25の上部には開口27、排出部2の下部には第2開口21が形成されている。そのため、キャップ20の上方から下方へ向けて、液体が通流可能である。また、キャップ側嵌合部25の内径は、前記バレル10のバレル側嵌合部13

の外径と嵌合可能な直径に形成されている。

【0033】

そして、図2に示すように、キャップ20のキャップ側嵌合部25の底部22に、核酸吸着性多孔性膜Fを配置した状態で、バレル10のバレル側嵌合部13をキャップ20のキャップ側嵌合部25へ嵌入することで、核酸吸着性多孔性膜Fをバレル10とキャップ20との間で挟持することができる。また、キャップ20の底部22には少なくとも3本、好ましくは6本の放射状に形成されたリブ26が形成されている。そして、このリブ26の角部は、キャップ側嵌合部25の底部22の中心に設けられた底部開口23に向かって下り傾斜形状を呈するように形成されている。

なお、バレル10、キャップ側嵌合部25および底部22で構成される部分が特許請求の範囲にいう「筒状本体」に相当し、キャップ20の底部開口23と第2開口21とを連通する筒として構成される排出部2が特許請求の範囲にいう「排出部」に相当し、この筒状本体と排出部とで筒状に構成されるものが特許請求の範囲にいう「筒状体」に相当する。

【0034】

[排出部および端面の構成]

次に、本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの排出部や排出部の端面の好適な構成について、図1および図2を参照しつつ、図3および図4を参照して詳細に説明する。

【0035】

図3の拡大断面図に示すように、核酸分離精製カートリッジNCの排出部2は、キャップ20の下半分を構成するものであり、筒状本体1の底部22の底部開口23に一端が連なり、他端が廃液を排出するための第2開口21を形成する筒として構成されている。このように構成することにより、核酸分離精製カートリッジNCの下部に配置された廃液容器100（図7参照）へ向かって正確に廃液を導くことができる。これは、例えば、後記する自動装置によって当該核酸分離精製カートリッジNCを多連で使用した場合に、他サンプルの溶液へのコンタミネーション防止に有効である。

なお、このキャップ20の第2開口21を形成する部分の端面24の肉厚Tは、0.2 mm以上に構成するのがよい。第2開口21を形成する部分の肉厚Tを0.2 mm以上となるように形成すれば、試料溶液S₁の泡がエアの巻き上げによって煽られた場合であっても、この第2開口21を形成する部分の肉厚Tを乗り越えて排出部2の外壁面2aに付着することはない。これは、肉厚Tを厚くするほど確実な効果がみられるので、肉厚Tを0.5 mm以上に形成することがさらに好ましい。

【0036】

また、核酸分離精製カートリッジNCのキャップ20の第2開口21の開口径rは1.0 mm以上に形成するのがよい。開口径rを1.0 mm以上に形成すると、廃液を良好に排出することができる。

【0037】

さらに、キャップ20の端面24の外径Rは、1.4 mm以上に形成するのがよい。排出部2の端面24の外径Rを1.4 mm以上とすれば、前記した肉厚Tを0.2 mm以上確保することができるほか、第2開口21を形成する部分の強度を高く保つことができる。なお、前記理由により、この外径Rは、2.0 mm以上であることがより好ましい。

【0038】

次に、同じく図3および図4を参照して、キャップ20の排出部2やキャップ20の端面24の形状について説明する。

キャップ20の排出部2は、端面24と外壁面2aとのなす角度 θ_1 を105°以下に構成するのがよい。このように構成することで、外壁面2aに泡が付着した場合であっても、泡は第2開口21の近傍に集まるので、洗浄液S₂によってこれを取り除くことができる。なお、排出部2の外壁面2aとのなす角度 θ_1 を100°以下とするのがより好ましく、95°以下とするのがさらに好ましい。

また、図4に示すように、排出部2の端面24の形状を第2開口21へ近づくにつれ開口径 r が広がる漏斗形状としてもよい。このようにすると、第2開口21の外縁部は外壁面2aと鋭角をもって形成されるので、下方からエアが巻き上がってきた場合であっても、泡は外縁部を越えて外壁面2aに付着し難くなる。

なお、この場合、排出部2の端面24と外壁面2aとのなす角度 θ_2 を、 30° 以上とするのがよい(図4参照)。 30° 未満とすると試料溶液 S_1 が端面24の外縁に集まり、前記した肉厚 T を確保した意味がなくなる。

【0039】

また、端面24および外壁面2aの樹脂親水性を高めるのが好ましい。すなわち、核酸分離精製カートリッジを構成する材質を濡れ易いものとするのが好ましい。端面24および外壁面2aを親水性とすることにより、洗浄液 S_2 の撥水作用を抑え、かつ、洗浄液 S_2 による泡の引き込みを行うことができる。

なお、当該核酸分離精製カートリッジNCのバレル10およびキャップ20の内壁面2bにおける排水性を考慮すると、この内壁面は撥水性であることが好ましく、疎水性合成樹脂を用いて核酸分離精製カートリッジNCを作製することが好ましい。

【0040】

ここで、疎水性合成樹脂を用いて作製した核酸分離精製カートリッジNCにおいて、キャップ20の端面24と外壁面2aの親水性を高めるには、以下の処理を施すことにより行うことができる。

まず、疎水性合成樹脂であるポリスチレンを用いて射出成形により第2開口21側を封じた状態のキャップ20を作製する。このとき、必要であれば、第2開口21の形状を前記した任意の形状に加工するのがよい。そして、キャップ20の端面24と外壁面2a(好ましくは第2開口21となる近傍の外壁面2a)をプラズマ処理することによって、端面24および外壁面2aの親水性を向上させる。このようにすることで内壁面2bは撥水性が高く、排出部2の外壁面2aおよび端面24の親水性が高いキャップ20を得ることができる。

なお、キャップ20とバレル10とを一体的に成形した核酸分離精製カートリッジNCであっても同様の処理を行うことで端面24と外壁面2aの親水性を高くすることができる。

【0041】

その他、疎水性合成樹脂に親水性を付与する方法としては、前記したプラズマ処理に限られることはなく、疎水性合成樹脂の表面を修飾し、親水性を向上させることのできる薬品等を用いることもできる。すなわち、射出成形したキャップ20の端面24および外壁面2aを当該薬品で処理することにより、外壁2aおよび端面24の親水性を向上させたキャップ20を得ることができる。

【0042】

また、図5に示すように、キャップ20の端面24に、泡を誘導するための爪部材28を形成するのが好ましい。また、この爪部材28を棒状に形成するのがより好ましい。さらには、この爪部材28の内側の位置が内壁面2bと一致するように形成するのが好ましい。このように構成することで、第2開口21に到達した泡は、内壁面2bに延設された棒状の爪部材28を伝ってその先端部分、すなわち、第2開口21よりさらに下方位置で凝集し易くなり、廃液容器100に落ち易くなる結果、泡の外壁面2aへの付着を防止することができる。

なお、この棒状の爪部材28は前記した目的を達成することができればよく、1本から複数本の間で任意の数を設けることができる。

【0043】

次に、図2へ戻って説明を続けると、リブ26は、放射状に形成されているため、液体を上方から下方へ流した際に、液体が排出部2へスムーズに流れ込むようになっている。

また、リブ26は、底部開口23側に下り傾斜形状を呈するように形成されているため、溶液等 S をバレル10の第1開口11側から加圧すると、核酸吸着性多孔性膜Fがリブ

26の傾斜形状に沿って、底部開口23側に向かって凸状に変形する。これにより、溶液等Sが、底部22に残留することなく、速やかに底部開口23から排出される。

【0044】

なお、バレル10およびキャップ20の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル等のプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好適に使用することができる。また、バレル10およびキャップ20は透明であっても、着色してあってもよい。

【0045】

また、核酸吸着性多孔性膜Fは、バレル10の開口縁部15とキャップ20の底部22との間に、その周縁部Faが潰れた状態で保持されている(図1参照)。これにより、核酸吸着性多孔性膜Fを通るべき液体(試料溶液S₁等)が、核酸吸着性多孔性膜Fの周縁を回り込む不具合を防ぐことができる。この核酸吸着性多孔性膜Fを安定して保持するためには、開口縁部15と底部22とを超音波溶着等により固着するのが好ましい。

【0046】

核酸吸着性多孔性膜Fとしては、イオン結合が関与しない弱い相互作用で核酸が吸着する多孔性膜が好適である。より好適には、核酸吸着性多孔性膜Fは、親水基を有する多孔性膜であり、多孔性膜を形成する材料自体が、親水基を有する多孔性膜、または多孔性膜を形成する材料を処理またはコーティングすることによって親水基を導入した多孔性膜である。多孔性膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでもよい。例えば、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔性膜、親水基をもたない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基をもたない有機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔性膜、親水基をもたない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基をもたない無機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜等を使用することができるが、加工の容易性から、多孔性膜を形成する材料は有機高分子等の有機材料を用いることが好ましい。

【0047】

また、核酸吸着性多孔性膜Fとしては、厚さが10～500 μ mである多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、厚さが50～250 μ mである多孔性膜を使用することができる。

【0048】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、最小孔径が0.22 μ m以上である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、最小孔径が0.5 μ m以上である多孔性膜を使用することができる。また、核酸吸着性多孔性膜Fには、最大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、最大孔径と最小孔径の比が5以上である多孔性膜を使用することができる。

【0049】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、空隙率が50～95%である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、空隙率が65～80%である多孔性膜を使用することができる。また、核酸吸着性多孔性膜Fには、バブルポイントが、0.1～10kgf/cm²である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、バブルポイントが、0.2～4kgf/cm²である多孔性膜を使用することができる。

【0050】

また、核酸吸着性多孔性膜Fには、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.1 μ g以上である多孔性膜を好適に使用することができる。より好適には、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.9 μ g以上である多孔性膜を使用することができる。

【0051】

[核酸分離精製カートリッジの使用法]

次に、本発明の核酸分離精製カートリッジの使用法について説明する。

本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジNCは、第1開口11側から第2開口21側へ向けて核酸を含む試料溶液S₁を不図示の圧力発生装置からの加圧ガス（例えば、加圧エア）によって強制的に通流させることができ、この試料溶液S₁に含まれる核酸を核酸吸着性多孔性膜Fに吸着させる。

次いで、核酸吸着性多孔性膜Fおよび核酸を洗浄するための洗浄液S₂を加圧エアによって強制的に通流させることでこれを洗浄する。

そして、吸着させた核酸を回収するための回収液S₃を、前記と同様に加圧エアによって強制的に通流させることによって、その核酸を回収する。

【0052】

以下、本発明の核酸分離精製カートリッジの使用方法についてさらに具体的に説明する。

本発明の試料溶液S₁を調製するための検体に制限はないが、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（またはその一部）、動物（またはその一部）等、あるいはそれらの溶解物およびホモジネート等の生物材料から調製された溶液が対象となる。なお、このような試料溶液は、従来公知の方法を用いることによって調製し、得ることもできる。

【0053】

最初にこれらの検体について細胞膜および核膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散し、核酸を含む試料溶液を得る。例えば、検体が全血の場合、これに塩酸グアニジン、T r i s、T r i t o n-X100、プロテアーゼK（S I G M A製）を添加し、60℃で10分インキュベートすることによって赤血球の除去、各種タンパク質の除去、白血球の溶解及び核膜の溶解を行って試料溶液S₁を得る。

【0054】

次に、このようにして得られた試料溶液S₁を、バレル10の第1開口11（図2参照）から第2開口21へ向けて圧力エアによる圧力をかけつつ通流させる。こうすると、試料溶液S₁中の核酸が核酸吸着性多孔性膜Fに吸着される。

【0055】

次に、図2に示すように、洗浄液S₂をバレル10の第1開口11から第2開口21へ向けて圧力をかけながら通流させる。なお、この洗浄液S₂は後記するように、核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を脱離させずに、不純物を脱離させる組成を有するものである。

【0056】

ここで、洗浄液S₂は、水溶性有機溶媒および塩の双方、または水溶性有機溶媒もしくは塩のうちいずれか1つを含んでいる溶液であることが好ましい。アルコール等の水溶性有機溶媒は、核酸が難溶性であるので、核酸を保持したまま核酸以外の成分を脱離するのに適している。また、塩を添加することにより、核酸の吸着効果が高まる。

【0057】

洗浄液S₂に含まれる水溶性有機溶媒として、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、ブタノール、アセトン等を用いることができるが、エタノールを用いることが好ましい。また、洗浄液S₂中に含まれる水溶性有機溶媒は、好ましくは20～100容量%であり、より好ましくは40～80容量%である。

【0058】

また、洗浄液S₂に含まれる塩は、ハロゲン化物の塩であることが好ましい。さらには、塩は、一価または二価のカチオンを含んでいることが望ましく、この塩を10mM以上含むことがより好ましい。さらに、塩は、塩化ナトリウムを用い、この塩化ナトリウムを20mM以上含むことがさらに好ましい。

【0059】

次に、精製蒸留水またはT Eバッファ等の回収液S₃をバレル10の第1開口11から第2開口21へ向けて加圧ガスにより圧力をかけながら通流させ、核酸を核酸吸着性多孔

性膜Fから脱離させて流し出し、排出部2から排出された回収液S₃（核酸を含有する回収液S₃）を回収する。

【0060】

なお、回収液S₃は、検体から調整した核酸を含む試料溶液S₁の体積に対して、回収液S₃の体積を調整して核酸の脱離を行うことができる。分離精製された核酸を含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100 μ lであるが、検体量が極微量である時や、逆に大量の核酸を分離精製したい場合には回収液量は1 μ lから数10 mlの範囲で変える事ができる。

【0061】

回収液S₃のpHは、pH2～11であることが好ましい。さらには、pH5～9であることが好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着核酸の溶出に効果を及ぼす。このため、回収液S₃は、290 mモル/L以下のイオン強度であることが好ましく、さらには、90 mモル/L以下の塩濃度であることが好ましい。こうすることで、核酸の回収率が向上し、より多くの核酸を回収することができる。

また、回収される核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）あるいはリボ核酸（RNA）であってもよく、さらに、これら核酸において1本鎖あるいは2本鎖のものであってもよい。

【0062】

ここで特に、回収対象とされる核酸がRNAである場合、RNA分解酵素（RNase）を不活性化させることが望ましい。特に、洗浄液S₂や回収液S₃を作製する水は、DEPC（Diethyl Pyrocarbonate）処理したものをを用いることが望ましい。

【0063】

このようにして得られた回収液S₃に含まれる核酸は、紫外可視分光光度計での測定値（260 nm/280 nm）が、DNAの場合は1.6～2.0、RNAの場合は1.8～2.2となる純度を有する。すなわち、不純物混入量の少ない高純度の核酸を定常的に得ることができる。さらには、紫外可視分光光度計での測定値（260 nm/280 nm）がDNAの場合は1.8付近、RNAの場合は2.0付近となる純度を持つ核酸を回収することができる。

【0064】

また、上記工程において、圧力発生装置としては、エアポンプを好適に用いることができるが、手動で操作する場合には、注射器、ピペットを用いることができ、この圧力発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（第1開口11側）に着脱可能に結合されている。

【0065】

そして、本発明の核酸分離精製カートリッジNCは、手動操作によって用いることも可能であるが、自動化された装置（以下、自動装置）において使用することが望ましく、かかる核酸分離精製カートリッジNCを多連として用いることを好適に示すことができる。

【0066】

[自動装置]

以下、核酸の精製を自動で行う自動装置（図示せず）に、本発明の核酸分離精製カートリッジNCを用いた場合について説明する。

自動装置は、溶液等Sが内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜Fを収容した核酸分離精製カートリッジNCを用い、当該核酸分離精製カートリッジNCに核酸を含む試料溶液S₁を注入し、加圧して当該試料溶液S₁中の核酸を前記核酸吸着性多孔性膜Fに吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジNCに洗浄液S₂を分注し、加圧して不純物を除去した後、前記核酸分離精製カートリッジNCに回収液S₃を分注し、核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を脱離して回収液S₃とともに回収する、分離精製動作を自動的に行う核酸分離精製装置であって、前記核酸分離精製カートリッジNC、前記試料溶液S₁および洗浄液S₂の排出液を収容する廃液容器100および前記核酸を含む回収液S₃を収容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジNCに加圧エアを導入

する加圧エア供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジNCに洗浄液S₂および回収液S₃を分注する分注機構とを備えてなることを特徴とするものである。

【0067】

前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、当該スタンドに上下移動可能に支持され前記核酸分離精製カートリッジNCを保持するカートリッジホルダーと、当該カートリッジホルダーの下方で前記核酸分離精製カートリッジNCに対する位置を交換可能に前記廃液容器100および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなるものが好適である。

【0068】

また、前記加圧エア供給機構は、下端部より加圧エアを噴出するエアノズルと、当該エアノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された前記核酸分離精製カートリッジNCに対し前記エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、当該加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジNCの位置決めをする位置決め手段とを備えてなるものが好適である。

【0069】

また、前記分注機構は、前記洗浄液S₂を分注する洗浄液分注ノズルと、前記回収液S₃を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄液分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し、前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジNC上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液S₂を収容した洗浄液ボトルより洗浄液S₂を吸引し前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液S₃を収容した回収液ボトルより回収液S₃を吸引し、前記回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなるものが好適である。

【0070】

上記のような自動装置によれば、核酸分離精製カートリッジNC、廃液容器100および回収容器を保持する搭載機構と、核酸分離精製カートリッジNCに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、核酸分離精製カートリッジNCに洗浄液S₂および回収液S₃を分注する分注機構とを備え、核酸吸着性多孔性膜Fを備えた核酸分離精製カートリッジNCに核酸を含む試料溶液S₁を注入・加圧し、核酸を核酸吸着性多孔性膜Fに吸着させた後、洗浄液S₂を分注して不純物を洗浄・排出した後、回収液S₃を分注して核酸吸着性多孔性膜Fに吸着した核酸を分離して回収する核酸分離精製工程を自動的に行って短時間で効率良く試料溶液S₁の核酸を自動的に分離精製できる機構をコンパクトに構成することができる。

【0071】

また、前記搭載機構を、スタンドと、核酸分離精製カートリッジNCを保持する上下移動可能なカートリッジホルダーと、廃液容器100および回収容器を交換可能に保持する容器ホルダーとを備えて構成すると、核酸分離精製カートリッジNCおよび両容器のセット並びに廃液容器100と回収容器の交換が簡易に行える。

【0072】

また、前記加圧エア供給機構を、エアノズルと、当該エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、核酸分離精製カートリッジNCの位置決めをする位置決め手段とを備えて構成すると、簡易な機構で確実な加圧エアの供給が行える。

【0073】

また、前記分注機構を、洗浄液分注ノズルと、回収液分注ノズルと、核酸分離精製カートリッジNC上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液ボトルより洗浄液S₂を吸引し洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液ボトルより回収液S₃を吸引し、回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えて構成すると、簡易な機構で順次洗浄液S₂および回収液S₃の分注を行うことができる。

【0074】

以上、本発明の実施形態について説明したが、本発明は前記実施形態には限定されない。例えば、前記実施形態では、核酸吸着性多孔性膜を1枚収容した核酸分離精製カートリ

ッジとしたが、核酸吸着性多孔性膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジとしてもよい。この場合、収容される複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであってもよい。

【図面の簡単な説明】

【0075】

【図1】本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの分解斜視図である。

【図2】本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジの断面図である。

【図3】本発明の一実施形態に係る核酸分離精製カートリッジのキャップの拡大断面図である。

【図4】本発明の他の実施形態に係る核酸分離精製カートリッジのキャップの拡大断面図である。

【図5】本発明の更なる他の実施形態に係る核酸分離精製カートリッジのキャップの拡大断面図である。

【図6】核酸分離精製ユニットの縦断面図である。

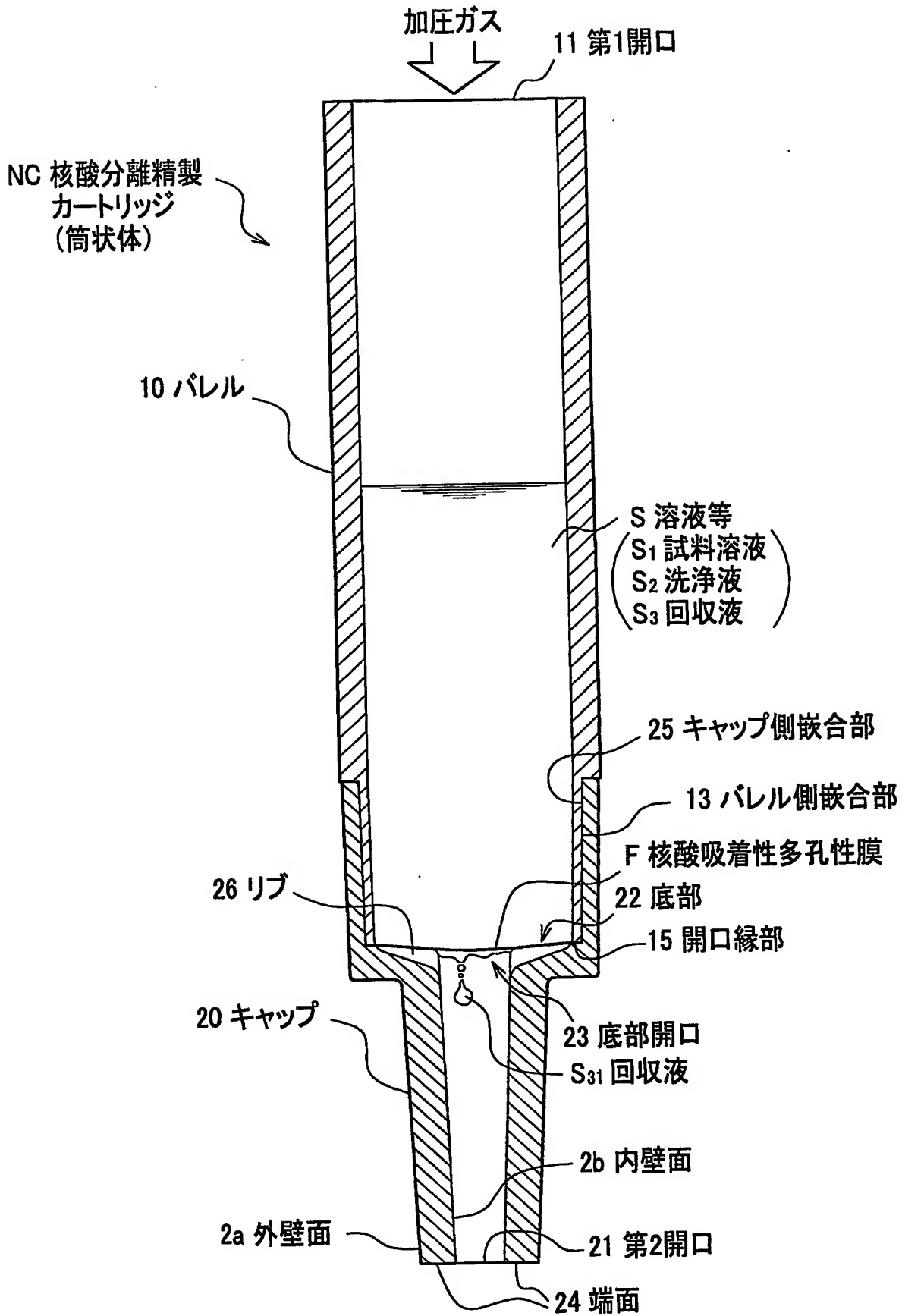
【図7】加圧により溶液を排出する核酸分離精製カートリッジを示した図である。

【符号の説明】

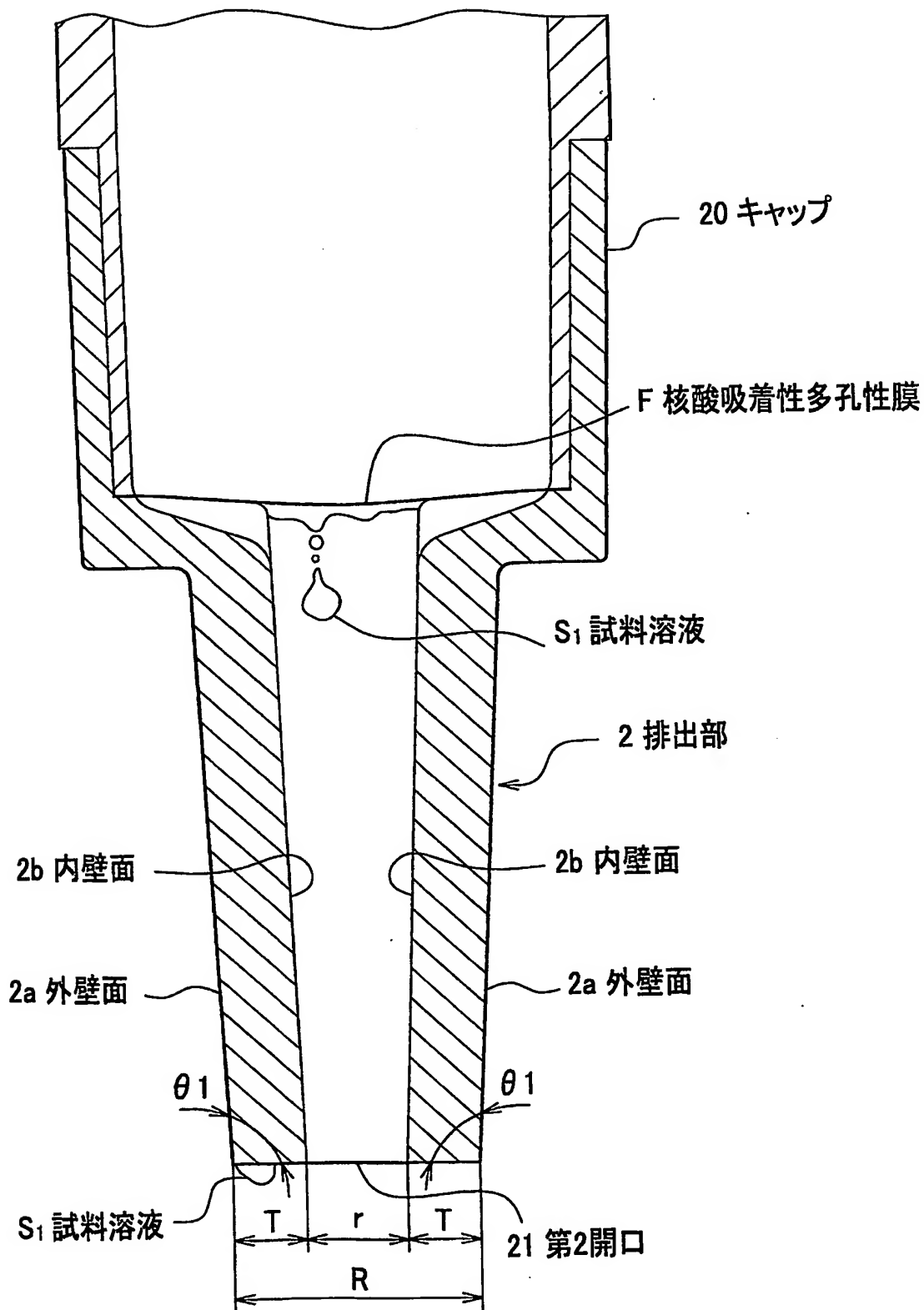
【0076】

NC	核酸分離精製カートリッジ
F	核酸吸着性多孔性膜
1	筒状本体
2	排出部
2 a	外壁面
2 b	内壁面
1 1	第1 開口
2 1	第2 開口
2 3	底部開口
2 4	端面
T	肉厚
r	開口径
R	外径
$\theta 1$	端面と外壁面とのなす角度
$\theta 2$	外壁面から内壁面へのなす角度

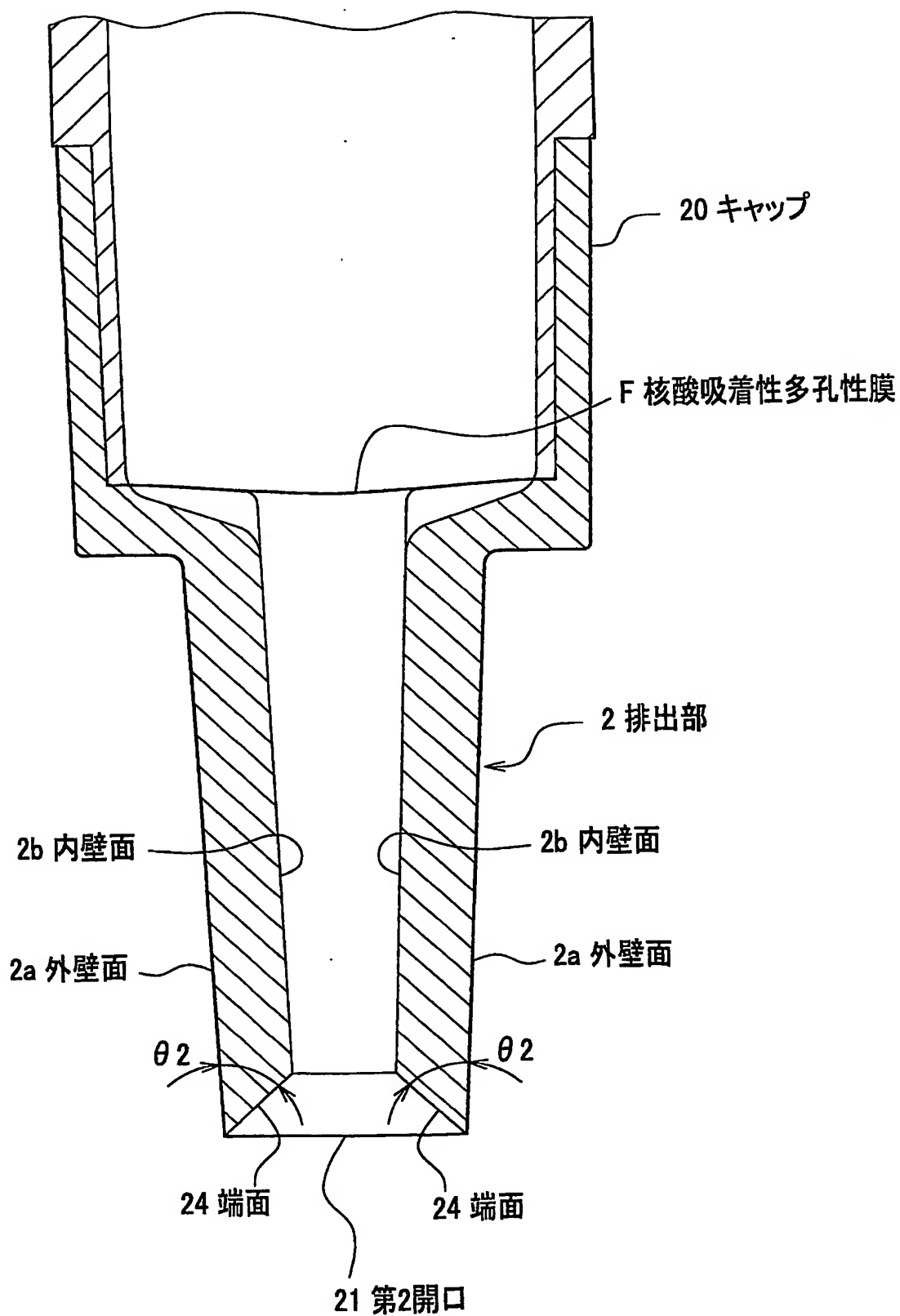
【図 2】



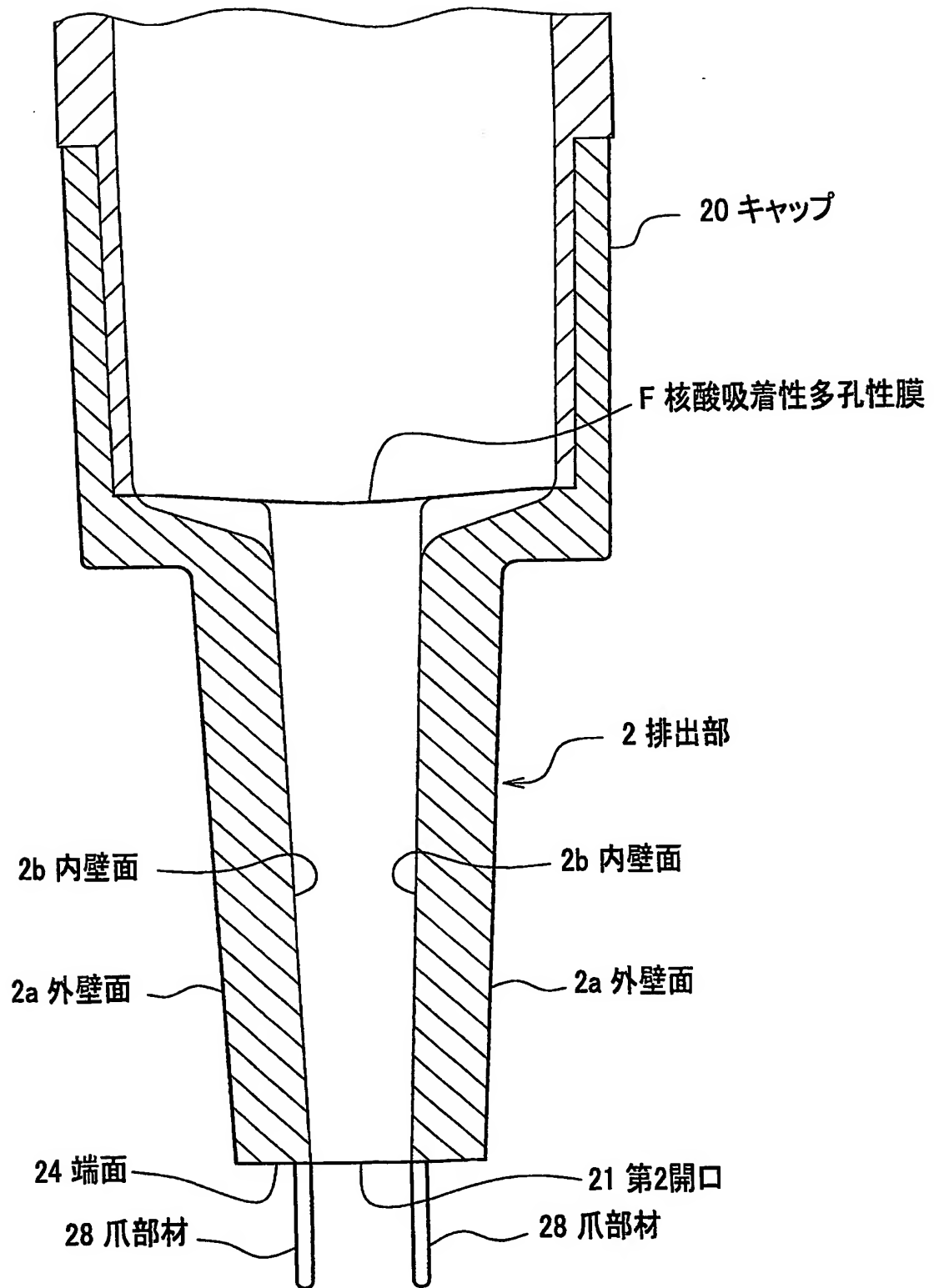
【図 3】



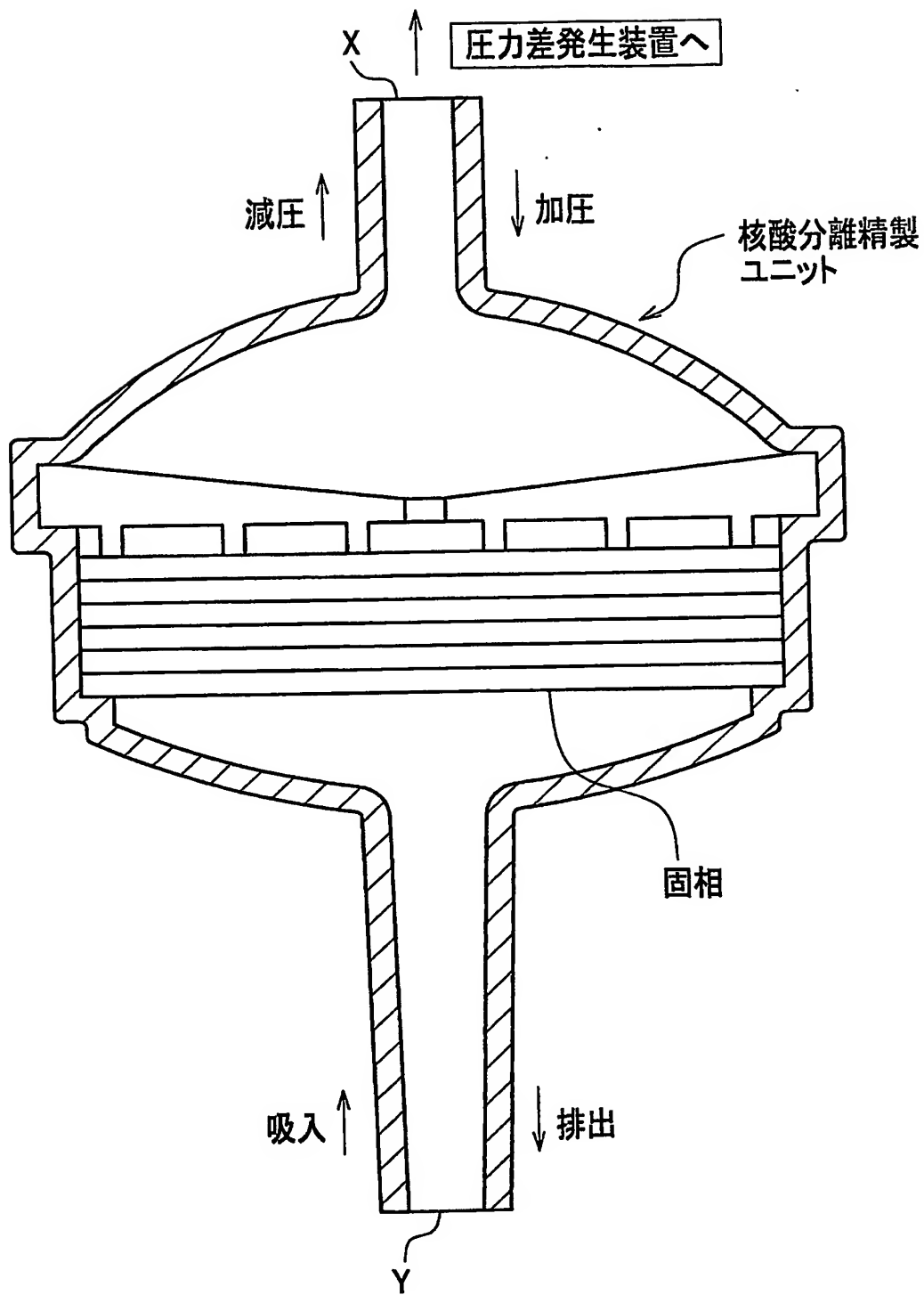
【図 4】



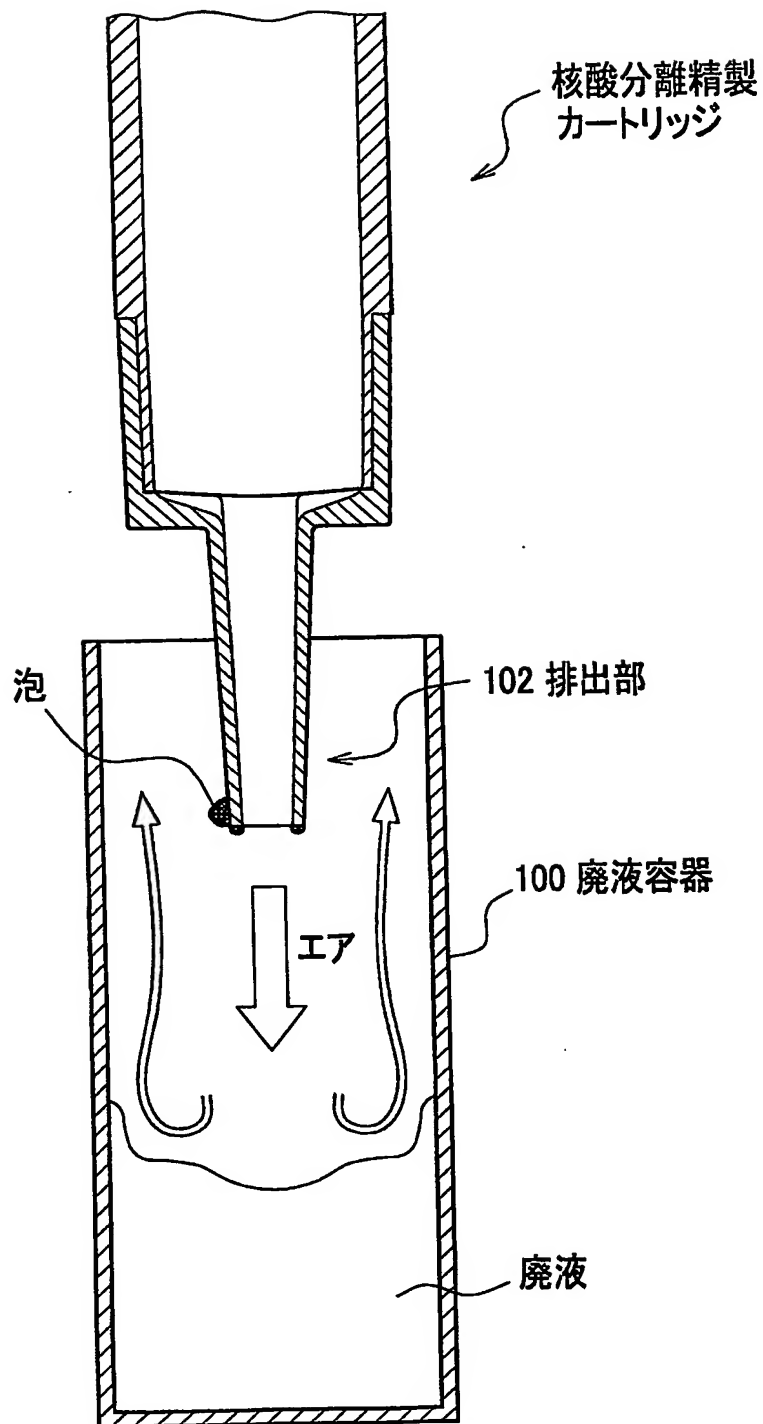
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 排出部の外壁に溶液等が付着しない構成とした核酸分離精製カートリッジを提供する。

【解決手段】 第1開口11と第2開口21を有する筒状体の内部に核酸吸着性多孔質膜Fを備え、第1開口11側から第2開口21側へ向けて核酸を含む試料溶液S₁を加圧ガスにより通流させることで、核酸吸着性多孔質膜Fに核酸を吸着させ、分離精製する核酸分離精製カートリッジNCであって、筒状体は、核酸吸着性多孔質膜Fを支持する底部22を有する筒状本体1と、底部22に形成された底部開口23と第2開口21とを連通する排出部2とを有し、排出部2の第2開口21を形成する部分の肉厚を0.2mm以上とした。また、排出部2の端面24の形状を第2開口21へ近づくにつれ開口径rが広がる漏斗形状とした。

【選択図】 図3

特願 2 0 0 3 - 3 6 1 1 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社